

**MEMORIA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:**

**“CÉLULAS TUMORALES**

**CIRCULANTES EN CÁNCER DE COLON**

**Y CÁNCER DE MAMA”**

**Autora:**

**VIRGINIA DE LA ORDEN GARCIA**

**Directora:**

**Dra. MARÍA LUISA MAESTRO DE LAS  
CASAS.**

**Curso 2009-2010**

**Tutora : Dra. Nieves Olmo López.**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**Universidad Complutense de Madrid.**

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN.

I.1. Cáncer de mama.

I.2. Cáncer de colon.

I.3. Nuevos Factores Pronóstico. Células Tumorales Circulantes (CTCs).

## II. OBJETIVOS.

II.1. Cáncer de mama.

II.2. Cáncer de colon.

## III. PACIENTES Y MÉTODOS.

III.1. Cáncer de mama.

III.1.1. Selección de la cohorte de pacientes.

III.1.2. Tratamiento de quimioterapia neoadyuvante.

III.1.3. Recogida de las muestras.

III.2. Cáncer de colon.

III.2.1. Selección de la cohorte de pacientes.

III.2.2. Recogida de las muestras.

III.3. Procesamiento de las muestras en ambos tipos de cáncer.

III.4. Análisis estadístico.

## IV. RESULTADOS.

IV.1. Cáncer de mama.

IV.2. Cáncer de colon.

IV.2.1. Resultados primer objetivo: correlación con variables clínico-morfológicas.

IV.2.2. Resultados segundo objetivo: valor pronóstico o predictivo de las CTCs en pacientes con cáncer de colon metastático.

IV.2.3. Resultados tercer objetivo: valor pronóstico en pacientes con  
cáncer de colon localizado.

V. DISCUSIÓN.

VI. CONCLUSIONES.

VII. ABREVIATURAS.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

IX. TRABAJOS PUBLICADOS POR EL EQUIPO SOBRE CTCs EN 2009.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Cáncer de Mama**

Según los registros del Instituto Nacional de Estadística, el tumor más frecuente en la mujer es el cáncer de mama, (50 casos por 100.000 españolas y año) con unos 15.000 casos totales anuales, primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres (alrededor de 6.000 muertes anuales), y la primera causa de todas las muertes en mujeres entre 35-54 años. El riesgo acumulado a lo largo de la vida que tiene una mujer de presentar un cáncer de mama es alrededor de un 10%, es decir, aproximadamente una de cada 8 a 15 mujeres presentará esta enfermedad a lo largo de su vida.

El Carcinoma Localmente Avanzado de Mama (CLAM) se caracteriza por una significativa afectación del volumen mamario, con un tumor de tamaño variable, pero que infiltra la piel, ulcerándola o no, y con infiltración de los ganglios linfáticos regionales. Esta definición está sometida a diversas matizaciones. Para algunos autores se trata de pacientes que no son susceptibles de tratamiento conservador, para otros son las pacientes no tributarias de resección quirúrgica de inicio y para la mayoría de autores, las pacientes con tumores en estadio III (T1-4 N2-3 M0, T3-4 Nx M0), excluyendo el carcinoma inflamatorio (1).

El CLAM lo conforman un grupo heterogéneo de tumores. Algunos son de gran tamaño con infiltración local, pero sin agresividad sistémica no teniendo afectación ganglionar, y otros son tumores más pequeños de crecimiento rápido y escasa afectación local, pero con grave diseminación hacia los ganglios. La incidencia del CLAM es muy variable, pero en nuestro medio supone entre el 15-20% de los tumores, con una supervivencia a los 5 años del 20-30%.

El tratamiento citotóxico neoadyuvante se basa en antraciclinas y taxanos (2). Las pacientes que responden a la quimioterapia neoadyuvante, continúan con cirugía

radical y posterior radioterapia sobre la pared torácica y cadenas ganglionares regionales. El control local con cirugía únicamente, se logra en el 50% de las ocasiones, por lo que precisa completar el tratamiento con radioterapia después de la resección del tumor. Por último las pacientes reciben quimioterapia y/o hormonoterapia adyuvante.

La eficacia de la quimioterapia neoadyuvante en CLAM se ha establecido en los últimos 25 años; inicialmente doxorubicina, y posteriormente, debido a la eventual resistencia a antraciclinas, la adicción de taxanos ha demostrado eficacia en CLAM incluso en respuestas completas patológicas. Las antraciclinas sólo consiguen una tasa de respuesta completa patológica de 5-15%, porque se sabe que puede haber resistencia durante el tratamiento con antraciclinas. Se ha demostrado que las respuestas completas patológicas se asocian a una mayor supervivencia. El estudio NSABP-27 comparó adriamicina-ciclofosfamida (AC) con docetaxel pre o postcirugía frente a AC solo. Las mujeres con docetaxel precirugía tuvieron mayor tasa de respuestas completas patológicas (26% vs 13,7%). El grupo de MD Anderson Cancer-Center también ha evaluado el tratamiento secuencial de taxano-antraciclina en este contexto, objetivando que la quimioterapia primaria podría aumentar la tasa de cirugías conservadoras (3).

Gracias a estos estudios el uso de tratamiento neoadyuvante con antraciclinas se considera estándar en el manejo de las mujeres con carcinoma localmente avanzado de mama (T3-T4, N2); la adicción de docetaxel reporta mayor tasa de respuestas completas patológicas y cirugías conservadoras y probablemente un impacto en la supervivencia. Queda por investigar nuevos parámetros pronóstico que permitan determinar, con exactitud, el pronóstico de las mujeres con CLAM, así como parámetros adicionales, de los que ya disponemos, para evaluar la respuesta al tratamiento neoadyuvante secuencial de adriamicina y docetaxel, para poder realizar cambios terapéuticos en caso de que el tratamiento resulte ineficaz.

## **I.2. Cáncer Colorrectal**

El cáncer colorrectal (CCR) es un importante problema de salud pública, tanto por su incidencia, como por tratarse de una de las principales causas de morbimortalidad en los países desarrollados. El CCR ocupa el segundo lugar en incidencia dentro de las neoplasias en los países industrializados. En España ocupa el segundo lugar en mortalidad en mujeres y el tercero en varones.

El tratamiento curativo más importante del CCR es el quirúrgico. A pesar de ello, el 50% de los pacientes intervenidos recidivarán, fundamentalmente en relación con el estadio, determinado por el nivel de invasión en la pared abdominal, la afectación ganglionar y la presencia de metástasis. En estadio II (tumores T3 y T4 sin afectación ganglionar) la supervivencia a 5 años es 60-80% y en estadio III (con afectación ganglionar) se estima en 30-60%. El propósito del tratamiento adyuvante es erradicar la enfermedad micrometastásica residual (4,5).

En los últimos años se están investigando marcadores que pudieran utilizarse como factores pronóstico para evaluar el riesgo de recaída que constituirían una herramienta más en la toma de decisiones terapéuticas después del tratamiento quirúrgico. Recientemente la inestabilidad de microsatélites (MSI) se ha identificado como una alteración genética que indica un pronóstico favorable en estos pacientes (6,7).

El tratamiento adyuvante del CCR ha sufrido cambios considerables en los últimos años. A principios de los años 90, la combinación de 5-FU más levamisol durante 1 año era considerado el tratamiento adyuvante estándar. Desde entonces, diferentes estudios han aportado datos que han originado grandes cambios. La reducción del tratamiento a 6 meses, la sustitución de levamisol por ácido folínico y,

posteriormente, la adición de oxaliplatino han sido los más significativos (8,9). El pronóstico de los pacientes con CCR metastásico se determina mediante las variables clínicas establecidas por Köhne *et al.*

### **I.3. Nuevos Factores Pronóstico. Células Tumorales Circulantes (CTCs)**

Son necesarios nuevos factores pronóstico que nos permitan seleccionar a los pacientes en estadios precoces candidatos para un tratamiento adyuvante, así como evaluar el pronóstico de pacientes con enfermedad metastásica. El concepto de metástasis engloba un complejo proceso de acontecimientos: las células tumorales del tumor primario atraviesan la membrana basal, penetran por las vías linfáticas y los vasos sanguíneos y se diseminan a tejidos distantes (10). La detección de células tumorales en sangre periférica pudiera ser relevante para identificar a los pacientes con diferente pronóstico y diferentes respuestas terapéuticas (11). Para poder identificarlas y cuantificarlas se precisan técnicas con gran sensibilidad y especificidad. La presencia de células tumorales circulantes podría ser de utilidad por los siguientes motivos:

- Como evidencia inicial del proceso metastático.
- Como marcador de riesgo de la posibilidad de metastatización y, por tanto, indicador de mal pronóstico.
- Como marcador para monitorizar la respuesta al tratamiento.

La primera publicación de CTCs se atribuye a Ashworh quien, en 1869, describió el caso de un paciente diagnosticado de cáncer con células en sangre, similares a las del tumor. Desde entonces se ha intentado buscar el significado de estos hallazgos, comprobándose la dificultad tecnológica para el aislamiento e identificación de estas células. Se han evaluado técnicas inmunohistoquímicas para la búsqueda de las CTCs o

en médula ósea (12,13). Sin embargo, estas técnicas se abandonaron debido a varios factores, entre ellos la ausencia de significado clínico y los resultados equívocos que incluían la detección de citoqueratinas y antígeno epitelial de membrana en células no epiteliales. Por ello, el mayor problema en la detección de las CTC han sido las diferentes técnicas utilizadas en su aislamiento y caracterización. Estos ensayos presentan grandes diferencias en cuanto a sensibilidad, reproducibilidad y especificidad en la detección de CTC en procesos neoplásicos y no neoplásicos. Por ello, es difícil comparar los resultados de los diferentes estudios. Por estas razones se han buscado nuevas técnicas que permitan el aislamiento y cuantificación de las células tumorales circulantes; de esta manera se han desarrollado técnicas inmunomagnéticas, la tinción con anticuerpos fluorescentes específicos y la cuantificación mediante citometría. Un método novedoso fue utilizado por Hardingham para detectar células circulantes en CCR, utilizando bandas inmunomagnéticas frente a K-ras; la detección de estas células se relacionaba con un pronóstico más desfavorable.

Un nuevo sistema de búsqueda celular (Veridex) se ha diseñado para detectar las células tumorales en la sangre periférica. El sistema es capaz de cuantificar las células epiteliales, que son separadas de la sangre con técnicas de bandas inmunomagnéticas marcadas con anticuerpos específicos, e identificar las células mediante anticuerpos marcados fluorescentemente anti-citoqueratinas y tinción fluorescente del núcleo. Este sistema permite cuantificar las CTC cuando se encuentran en concentraciones muy bajas. Cristofanilli *et al* muestran que la detección de CTC, utilizando el CellSerch, es rara en personas sanas y con enfermedad benigna (14).

En pacientes con carcinoma de mama metastásico, la presencia de 5 o más CTC en 7,5 mL de sangre en el momento de su diagnóstico y antes de iniciar la primera



línea de tratamiento está asociada a una menor supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE). El nivel de CTC a las 3 ó 4 semanas de iniciar el tratamiento predice la eficacia del mismo, la SG y la SLE (14).

Allard *et al* evaluaron la precisión, reproducibilidad y linealidad de este nuevo sistema de detección y concluyeron que esta técnica es reproducible en diferentes laboratorios. Realizaron el aislamiento y cuantificación de las CTC en sujetos sanos y establecieron la detección de  $\geq 2$  CTC en 7,5 mL de sangre como anormal. También analizaron las CTC en diferentes tumores metastásicos, incluyendo el CCR en el que observaron un 30% de pacientes con CTC (15).

Actualmente se está llevando a cabo un estudio de viabilidad, a modo de control de calidad externo sobre el uso del sistema CellSearch. Este estudio está coordinado por el Departamento de Oncología Médica, del *Erasmus Medical Center*, de Rotterdam, y en el que nuestro grupo participa, junto con otros 13 centros en toda Europa. Por otro lado, es también importante en esta reproductibilidad, conocer el hecho de que la liberación de CTCs al torrente sanguíneo se produce de forma uniforme a lo largo de las 24 horas del día (26).

## **II. OBJETIVOS**

El objetivo principal en este estudio es la detección, cuantificación y estudio del papel pronóstico de las células tumorales en sangre periférica de las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado y con cáncer de colon.

### **II.1 Cáncer de mama**

Los objetivos específicos en el cáncer de mama localmente avanzado son:

1. Estudiar qué papel predictivo de respuesta al tratamiento tienen la detección y la cuantificación de células tumorales en sangre periférica, a las 3 semanas y a las 12 semanas de haber comenzado el tratamiento de quimioterapia neoadyuvante. Para ello se comparan los cambios entre la primera y las segundas determinaciones de células tumorales en sangre periférica.

2. Analizar la diferencia en la tasa de respuesta, medida como la disminución o eliminación de células tumorales periféricas, que pudiera existir entre las dos secuencias de tratamiento (Adriamicina-Docetaxel <AT> versus Docetaxel-Adriamicina <TA>).

## **II.2. Cáncer de colon.**

Los objetivos específicos en el cáncer de colon son:

1. Determinar si existe correlación entre el número de células circulantes tumorales y el estadio de la enfermedad al diagnóstico, según la clasificación TNM.

2. En pacientes con estadios II y III del TNM, determinar el valor de las células tumorales circulantes como factor predictivo de recidiva y como factor pronóstico, independientemente de las variables pronósticas clásicas.

3. En pacientes en estadio IV, determinar si existe relación entre el número de células circulantes tumorales y el subgrupo pronóstico determinado mediante variables clínicas, y evaluar su importancia pronóstica.

## **III. PACIENTES Y MÉTODOS**

### **III. 1. Cáncer de mama**

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. Como se ha comentado en la introducción, se parte de la hipótesis de que la detección de 5 o más de 5 células tumorales circulantes en 7,5 mL de sangre periférica, previo al tratamiento

quimioterápico neoadyuvante en las mujeres con cáncer de mama localmente avanzado, es un factor independiente de mal pronóstico en lo que se refiere al intervalo libre de progresión y a SG, respecto a las pacientes con detección de menos de 5 células en la misma cantidad de sangre periférica (15).

Además, la comparación de esta primera extracción con sendas determinaciones de las células circulantes tumorales, a las 3 semanas y a las 12 semanas (previo al tratamiento quirúrgico), en las pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, supondrá un indicador de la respuesta a dicho tratamiento.

#### III.1.1. Selección de la cohorte de las pacientes.

Se incluirán todos los casos incidentes de CLAM diagnosticados en el Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico San Carlos. Se precisará confirmación histopatológica previa al tratamiento, mediante una biopsia y las pacientes tendrán una función orgánica adecuada y una fracción de eyección del ventrículo dentro de los límites normales, como para poder recibir tratamiento neoadyuvante con adriamicina o con docetaxel. Se excluirán las mujeres con cáncer de mama cuya estadificación no corresponda a un carcinoma localmente avanzado de mama, a las pacientes que por edad, comorbilidad, o por función ventricular inadecuada, no sean subsidiarias de tratamiento de quimioterapia neoadyuvante con adriamicina o docetaxel y a los varones con cáncer de mama. La estimación del tamaño muestral será de 109 pacientes.

#### III.1.2. Tratamiento de quimioterapia neoadyuvante.

De forma aleatoria se administrará tratamiento de quimioterapia neoadyuvante con uno de los protocolos asistenciales: adriamicina 75 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días, o bien docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> cada 21 días. Tras tres ciclos, las pacientes con respuesta objetiva

a la quimioterapia neoadyuvante, completarán el tratamiento con cirugía oncológica en nuestro Servicio de Ginecología. Finalmente completarán tratamiento adyuvante con tres ciclos adicionales del fármaco que no recibieron previamente. Todas las mujeres recibirán, secuencialmente tras la quimioterapia adyuvante, radioterapia complementaria sobre región del primario y cadenas linfoganglionares regionales, y posteriormente, las pacientes con tumores que presenten receptores hormonales positivos recibirán tratamiento de hormonoterapia. La randomización se realizará mediante un programa informático de generación aleatoria de números.

### **III.1.3. Recogida de las muestras para este estudio.**

A cada paciente se le recogerán tres extracciones de sangre periférica: la primera antes de iniciar el tratamiento de quimioterapia, la segunda a las 3 semanas de haber comenzado el tratamiento justo antes del segundo ciclo de quimioterapia y la tercera tras 4 ciclos de quimioterapia neoadyuvante (a las 12 semanas), justo antes del tratamiento quirúrgico.

## **III.2. Cáncer de colon**

En el cáncer de colon existe un estudio previo que muestra que el sistema de CellSearch identifica, mediante las citoqueratinas 8,18 y 19, las células tumorales circulantes. Es necesario comprobar si la cuantificación de estas células presenta relación con los factores pronóstico utilizados en el manejo de este tumor, si se relaciona con el pronóstico, sobre todo en los pacientes metastásicos y si nos permite predecir a qué pacientes en estadio II se les debe administrar terapia adyuvante.

### **III.2.1. Selección de la cohorte de las pacientes**

Para el objetivo 2 se incluirán a los pacientes diagnosticados de cáncer de colon en estadios II y III en el Hospital Clínico San Carlos. Para cumplir el objetivo 3 se incluirán los pacientes en estadio IV. Se precisará confirmación histopatológica en los 2 meses previos de adenocarcinoma de colon, definido como tumoración por encima de 15 cm del margen anal. Se excluirán a los pacientes que hayan recibido tratamiento quimioterápico previo y/o con el diagnóstico de otra neoplasia previa o concomitante. La estimación del tamaño muestral será de 100 pacientes para cumplir el objetivo 2 y 30 pacientes para el objetivo 3.

### **III.2.2. Recogida de muestras.**

En la cohorte de pacientes del objetivo 2 se extraerá una muestra de sangre periférica 3 semanas después del tratamiento quirúrgico, inmediatamente antes de comenzar el tratamiento de quimioterapia. Posteriormente, se extraerán muestras cada 6 meses, durante el seguimiento de la evolución de su enfermedad. En la cohorte de pacientes del objetivo 3 se extrae una muestra antes del inicio del tratamiento de quimioterapia y posteriormente cada 3 meses, dependiendo de la evolución.

### **III.3. Procesamiento de las muestras en ambos tipos de cáncer.**

Las muestras se recogerán en tubos *Cellsave*® que permiten preservar las células 96 horas a temperatura ambiente. Durante la extracción nos aseguraremos de que no se introduzcan células epiteliales de la epidermis, ya que estas podrían dar como resultado falsos positivos. Para ello, siempre hay que descartar la primera sangre de la extracción, recogiendo una pequeña fracción en otro tubo, antes de proceder al llenado del *Cellsave*®. Es importante que la extracción se realice directamente en el tubo, sin pasar por jeringa, para evitar la formación de coágulos y se debe agotar el vacío (10 mL). La solución preservante debe ser mezclada suficiente y suavemente con todo el volumen de

sangre. Las muestras de sangre periférica se procesan en un sistema semiautomático, en el *CellTracks® AytoPrep System* que permite identificar por fluorescencia las células epiteliales marcadas con los anticuerpos anti-EpCAM (anticuerpos frente a la molécula de adhesión de la célula epitelial) y anti-citoqueratina (CK-PE: citoqueratina 8, 18 y ficoeritrina-19) con fluoresceína y la tinción para ácidos nucleicos (DAPI). Los leucocitos, al ser células nucleadas y teñirse con DAPI, se distinguen mediante el anti-CD45 marcado con fluoresceína. Los resultados son analizados por el analizador celular: *CellSpotter Analyzer®*. Las imágenes escaneadas por el sistema se deben interpretar por dos investigadores, expertos formados específicamente en la identificación celular. La interpretación de las imágenes es un proceso laborioso y que precisa mucho tiempo de dedicación. Para clasificar una imagen como una CTC, las células deben cumplir el siguiente criterio: morfología redonda a oval, mayor a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, citoplasma teñido positivamente con CK-PE y negativamente para CD-45, además, una proporción mayor al 50% del núcleo teñido con DAPI debe encontrarse claramente dentro del citoplasma. Los resultados se expresan como número de CTCs por 7.5 mL de sangre.

#### **III.4 Análisis Estadístico.**

La variable principal será el número de células tumorales circulantes en sangre periférica. Se recogerán en cada uno de los dos grupos las curvas de intervalo libre de progresión, supervivencia global y tasa de respuesta antitumoral. El intervalo libre de progresión se define como el tiempo transcurrido en meses, desde el comienzo del estudio justo antes de empezar el tratamiento de quimioterapia y el momento de progresión tumoral. La supervivencia global son los meses entre el principio de estudio y la fecha de fallecimiento. La tasa de respuesta se define como la evaluación estándar de la enfermedad a las 9-12 semanas de empezar el tratamiento: Beneficio clínico

(respuesta completa, respuesta parcial y estabilización tumoral) frente a Progresión tumoral. Las curvas de progresión y supervivencia de cada grupo se comparan utilizando el *test log-rank*.

#### **IV. RESULTADOS**

El objetivo de este proyecto es la detección, cuantificación y estudio del papel pronóstico de las CTCs de las pacientes con CLAM y con CCR. Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. Para ello se seleccionarán 90 pacientes con carcinoma de mama localmente avanzado, 100 pacientes diagnosticados de cáncer de colon en estadio II y III y 30 pacientes con carcinoma metastásico de colon. Las muestras de sangre periférica se procesan en un sistema semiautomático, en el *CellTrack® AutoPrep System* que permite identificar por fluorescencia las células epiteliales marcadas.

##### **IV.1. Cáncer de mama localmente avanzado:**

Durante el periodo del estudio se han enrolado un total de 77 pacientes con CLAM, que recibían quimioterapia neoadyuvante: adriamicina o docetaxel. Cinco fueron excluidas debido a fallos de procesamiento en alguna de sus muestras, con lo que se tomaron en cuenta en el estudio las 72 restantes.

Tras 12 meses se observó un inesperado bajo número de pacientes con 2 o más CTCs en la primera muestra. Además se observa que las pacientes con 0 CTCs en la primera muestra son más propensas a tener 0 CTCs en la segunda también.

La tabla 1 presenta las características clínicas y patológicas de todas las pacientes, distinguiendo entre las que tenían  $\leq 1$  CTC y las que tenían  $\geq 2$  CTCs en la primera muestra. No se observaron diferencias por la edad, estadio, grado del tumor o índice de proliferación entre las pacientes con  $\leq 1$  CTC y aquellas con  $\geq 2$  CTCs. Se

observó clínicamente, pero no estadísticamente significativo, el hecho de que las pacientes con  $\geq 2$  CTCs presentan un mayor porcentaje de tumores negativos para el receptor de estrógenos o el de progesterona y tumores triplemente negativos (estrógeno-negativo  $p=0.07$  (OR 0.33, 95% IC 0.1-1.1); progesterona-negativo  $p=0.07$  (OR 0.31, 95% IC 0.1-1.1); triple negativo  $p=0.01$  (OR 0.34, 95% IC 0.1-1.3)).

	Todas las pacientes (n=72)	Pacientes con $\leq 1$ en la 1ª muestra (n=60)	Pacientes con $\geq 2$ en la 1ª muestra (n=12)
Edad media	50 años	50 años	46 años
Estadío IIIB	20 (28%)	17 (28.3%)	3 (25%)
Tumor grado III	25 (35%)	21 (35%)	4 (33%)
ER positivo	45 (63%)	41 (68%)	5 (42%)
EP positivo	40 (56%)	37 (62%)	4 (33%)
HER positivo	17 (24%)	15 (25%)	2 (17%)
Triple negativo	13 (18%)	9 (15%)	4 (33%)
Índice de proliferación media	25%	30%	23%

Tabla 1: Características clínicas y patológicas de las pacientes. Relación con el número de CTCs

Sesenta de las 72 pacientes tuvieron  $\leq 1$  CTC en la primera muestra de sangre. Entre las 42 pacientes iniciales con  $\leq 1$  CTC en la primera muestra, solo 2 tuvieron  $\geq 2$  CTCs en la segunda (2 y 7 CTCs respectivamente). En este punto se decidió no obtener más muestras en las pacientes con  $\leq 1$  CTCs en la primera extracción. Las tasas de respuesta en pacientes con  $\leq 1$  CTC en las dos muestras fue como sigue: respuesta patológica completa (RPC), 2 (5%); respuesta parcial (RP), 35 (87.5%); enfermedad



estable (EE), 2 (5%); enfermedad progresiva (EP), 1 (2.5%). Las tasas de respuesta en las 2 pacientes con  $\geq 2$  CTCs en la segunda muestra fueron: RPC, 1 (50%); RP, 1 (50%).

Doce de las 72 pacientes tuvieron  $\geq 2$  CTCs (rango 2-32) en la primera muestra. Todas presentaron menos CTCs en la segunda muestra. Las tasas de respuesta en estas pacientes fueron: RPC, 4 (34%); RP, 6 (50%); EE, 1 (8%); EP, 1 (8%). En esta cohorte la RPC fue más probable ( $p < 0.0042$ ; OR 14.5, 95% IC 2.3-92).

#### **IV.2. Cáncer de colon:**

Al final de 2009 se han analizado un total de 54 pacientes con cáncer de colon metastático, de los cuales hay suficiente seguimiento para el análisis de 36 de ellos y 129 pacientes con estadio II o III con un seguimiento mínimo de 1 año.

##### **IV.2.1 Resultados 1<sup>er</sup> objetivo: Correlación con variables clínico-morfológicas.**

Para este objetivo se analizaron los resultados de los primeros 97 pacientes con CCR en cualquiera de sus estadios evolutivos incluidos y se analizaron en relación con una cohorte de 30 voluntarios sanos. Los voluntarios sanos presentaron 0 y en alguna ocasión 1 CTC, lo que coincide con lo publicado por otros autores y justifica un nivel de corte de  $\geq 2$  CTCs para este objetivo del estudio. CTCs  $> 2$  se obtuvieron en el 36.2% de los pacientes con cáncer de colon. Se observó una correlación estadísticamente significativa con el estadio de la enfermedad, de forma que los pacientes con enfermedad metastásica presentaban con mayor frecuencia valores significativamente mas altos de CTCs en sangre periférica (60.7% estadio IV, 24.1% estadio III, 20.7% estadio II,  $p = 0.005$ ). No se encontró correlación entre la positivada para CTCs y la localización del tumor primario, los niveles de CEA ó LDH, ni el grado de diferenciación tumoral (Tabla 2).

Variables Clínico-patológicas	Numero de CTCs/ 7.5 ml		p value
	$\geq 2$ CTCs	$< 2$ CTCs	
Estadio			
I	4 (50%)	4 (50%)	p = 0.005
II	6 (20.7%)	23 (79.3%)	
III	7 (24.1%)	22 (75.9%)	
IV	17 (60.7%)	11 (39.3%)	
Localización			
Ascendente	9 (25.7%)	26 (74.3%)	p = 0.329
Transverso	4 (66.7%)	2 (33.3%)	
Descendente	3 (33.3%)	6 (66.7%)	
Sigma	13 (41.9%)	18 (58.1%)	
Recto	4 (33.3%)	8 (66.7%)	
Grado de diferenciacion			
Bien	9 (42.9%)	12 (57.1%)	p = 0.364
Moderado	13 (27.7%)	34 (72.3%)	
Indiferenciado	0	1 (100%)	
CEA			
$> 5$ ng/ml	11 (55%)	9 (45%)	p = 0.079
$\leq 5$ ng/ml	23 (33.3%)	46 (66.7%)	
LDH			
$> 1$ x ULN	7 (53.8%)	6 (46.2%)	p = 0.153
$\leq 1$ x ULN	27 (33.3%)	46 (66.7%)	

Tabla 2: Correlación con variables clínico morfológicas

#### IV.2.2. Resultados 2º objetivo: Valor pronóstico ó predictivo de las CTCs en pacientes con cáncer de colon metastático.

No se encontró un mayor porcentaje de positividad para CTCs ( $\geq 2$ ) en el subgrupo de pacientes de mal pronóstico según los estándares actuales, en relación con

los subgrupos de pronóstico intermedio o bueno, lo que sugiere que la presencia de CTCs no va explícitamente ligada a la carga tumoral ni al estado general del paciente (CTCs  $\geq 2$ : 62.5% en mal pronóstico, 50% en pronóstico intermedio y 63.4% en buen pronóstico). Partiendo de un nivel de corte de  $\geq 3$  CTCs para la enfermedad metastásica, ya demostrada su significación pronóstica por otros autores, el 55% de nuestros pacientes presentaron  $\geq 3$  CTCs en sangre periférica al inicio del tratamiento quimioterápico. No se encontraron diferencias en la tasa de respuestas ó control de la enfermedad tumoral (Respuestas completas + Respuestas parciales+ Enfermedad estable) a la quimioterapia en función de los niveles basales de CTCs (87.5%  $< 3$  CTCs vs 85%  $\geq 3$  CTCs,  $p = 0.829$ ). La mediana de supervivencia libre de progresión fue de 9 meses para toda la serie analizada, sin diferencias entre los pacientes con recuentos basales de CTCs  $< 3$ , ó  $\geq 3$  CTCs (9 meses para ambos grupos). Cuando se excluyeron los pacientes en los cuales se realizó una intervención quirúrgica de rescate de la enfermedad metastásica hepática, tampoco se encontraron diferencias significativas de supervivencia libre de progresión en función del recuento basal de CTCs (9 meses para  $< 3$  CTCs y 8 meses para  $\geq 3$  CTCs). Los resultados de supervivencia global no son aún lo suficientemente maduros en el tiempo para proceder a su análisis.

#### IV.2.3. Resultados del 3er objetivo: Valor pronóstico en pacientes con cáncer de colon localizado.

De los 129 pacientes analizados con un seguimiento mínimo de 1 año, la distribución por estadio fue: 10 estadio I (7,8%), 61 estadio II (47,3%) y 58 estadio III (45%). Hasta el momento, con una mediana de seguimiento de 24 meses, se han producido un total de 18 recidivas (14%), de las cuales 5 corresponden a estadio II y 13 a estadio III. No hay recidivas en el estadio I. Estos datos están por debajo de los datos

de la literatura e indican la inmadurez en el tiempo de la serie, precisándose al menos 1 año más de seguimiento para obtener resultados maduros. No obstante, el análisis con el seguimiento actual, muestra que no hay diferencias en la tasa de recidivas en el estadio II en función del recuento de CTCs, siendo del 8.3% tanto para los pacientes con CTCs  $\geq 2$  como  $< 2$ . En cambio para los pacientes en estadio III se observa una tendencia a mayor recidivas en el subgrupo de CTCs  $\geq 2$  que en aquellos con menos de 2 CTCs basales, aunque por el momento no se alcanzan valores estadísticamente significativos (33,3% vs 20.4%, HR 1,95 IC 0.41-9.19,  $p = 0.303$ ). Tomando como valor de corte de positividad para las CTCs  $\geq 1$ , el 18.2% de los pacientes en estadio II con  $\geq 1$  CTCs recidivaron frente al 2.7% de los que presentaron 0 CTCs ( $p = 0.039$ ). Para el estadio III, el 28.6% de los pacientes con  $\geq 1$  CTCs recidivaron por tan solo el 19% de los que tenían basalmente 0 CTCs ( $p = 0.452$ ).

## **V. DISCUSIÓN**

El cáncer de mama y el de colon son un problema de salud pública de primera magnitud en nuestro medio, por su elevada incidencia y prevalencia, por su tasa de mortalidad, así como por las altas tasas de curación que se pueden obtener gracias a la selección del tratamiento más adecuado tras un profundo conocimiento de los diferentes factores pronósticos.

Precisamos de estudios que permitan individualizar el tratamiento, en función tanto del riesgo, como de la evaluación precoz de la respuesta antitumoral a los diferentes agentes citotóxicos utilizados, en el tratamiento neoadyuvante del carcinoma localmente avanzado de mama y en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon.

Actualmente se están probando varios métodos para evaluar el resultado y predecir la respuesta de las terapias anticancerosas. Estos métodos ofrecen una oportunidad de estratificar los pacientes en los estudios de investigación y ofrecen también un nuevo tratamiento si no logran beneficiarse de la terapia (16,17). Por lo tanto se podría disponer de tratamientos más individualizados (18).

En la última década se han estado desarrollando técnicas de biología molecular (19). Las técnicas disponibles para detectar CTCs o de médula ósea han sido el análisis inmunoquímico o la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR). La desventaja de la RT-PCR es su limitación a la hora de cuantificar estas células. Por lo tanto se han buscado nuevos procedimientos para aislar y enumerar CTCs. Por ejemplo, la detección cuantitativa de CTCs mediante real time RT-PCR cuantitativa (20). Otros métodos que también se han estado desarrollando son: aislamiento inmunomagnético, tinción con anticuerpos fluorescentes, enumeración celular mediante microscopía de fluorescencia (21), microchips de CTCs (tecnología desarrollada en el Centro para el Cáncer del Hospital General de Massachussets, en colaboración con el Centro de Investigación de Sistemas Biomicroelectromagnéticos), microfiltro para CTCs: filtro ISET (Asociación Americana para la Investigación del Cancer (AACR) 100ª Reunión Anual: Resumen 2608. Presentada el 20 de Abril de 2009).

La incidencia del CLAM en nuestro medio es del 15-20% de las pacientes con cáncer de mama, y presenta, con tratamientos multimodales, una supervivencia a los 5 años del 20-30%.

La detección de CTCs, en las mujeres con CLAM, representa una posibilidad para estimar el pronóstico antes del tratamiento de quimioterapia neoadyuvante, y

además permitirá conocer, de manera muy temprana, la respuesta a dicho tratamiento. Esta evaluación muy inicial de la respuesta antitumoral, permitirá conocer si el tratamiento es adecuado o hay que realizar un cambio inmediato del agente citotóxico neoadyuvante.

A partir de estos hechos, se plantea la hipótesis de que la medición de las CTCs puede ser importante en la evaluación del resultado y en la predicción de la respuesta a la terapia neoadyuvante en pacientes de CLAM, por ejemplo.

Desafortunadamente, los resultados hasta ahora en este sentido, no nos llevan a demostrar el papel del aislamiento y enumeración de CTCs en la predicción de la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante con adriamicina o docetaxel en pacientes con CLAM.

Aunque ha sido determinado que la presencia de CTCs es común en pacientes con cáncer de mama metastático, hasta ahora, este estudio revela que las CTCs son infrecuentes en pacientes con CLAM (17). En este estudio, solo el 16.7% de las pacientes tuvieron >2 CTCs en el momento del diagnóstico. Por lo tanto, el aislamiento y enumeración de CTCs podría ser inapropiado en estos casos, y se deberían explorar nuevos métodos para predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

A pesar de que el tamaño muestral puede llevarnos a no encontrar diferencias entre pacientes con  $\leq 1$  CTC y aquellos con  $\geq 2$  CTCs, las características patológicas de estos grupos sí difieren. A pesar de no existir diferencias en la edad, grado tumoral y estadio, los tumores en las pacientes con  $\geq 2$  CTCs eran más propensos a ser negativos para el receptor de estrógenos o de progesterona y tumores triple negativos. Esto sugiere que las células triple negativas en el cáncer de mama tienden a encontrarse en la sangre periférica, probablemente debido a su comportamiento más agresivo.

Solo dos pacientes sin CTCs en la primera muestra, tuvieron  $\geq 2$  CTCs en la segunda; estos alcanzaron una buena respuesta patológica sometiéndose a quimioterapia neoadyuvante. Consecuentemente, el aislamiento y enumeración de CTC, no parece ser útil a la hora de predecir la respuesta patológica en pacientes con CLAM con  $\leq 1$  CTC en el diagnóstico.

Las 12 pacientes con  $\geq 2$  CTCs en la primera muestra tuvieron menos CTCs en la segunda. La tasa de respuesta patológica completa a terapia neoadyuvante en estos pacientes fue marcadamente mejor en comparación con los pacientes de  $\leq 1$  CTC en la primera muestra. Como consecuencia, el aislamiento y enumeración de CTCs puede ser de utilidad en la predicción de la respuesta en pacientes con CLAM con  $\geq 2$  CTCs en el momento del diagnóstico.

De esto se puede concluir que la presencia de CTCs previamente a la terapia neoadyuvante puede ser un predictor de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante en CLAM. Y no se debería recomendar investigar el uso de este método en pacientes con  $\leq 1$  CTC.

La detección de CTCs en los pacientes con CCR, como expresión del fenómeno de metástasis, podría tener importante implicaciones clínicas, tanto en la selección de pacientes en estadios precoces candidatos para un tratamiento adyuvante, como en el pronóstico de pacientes con enfermedad metastásica. Presenta un gran interés científico y asistencial en la clínica el poder seleccionar qué subgrupo de pacientes en estadio II se beneficiaría del tratamiento quimioterápico adyuvante.

En cuanto a nuestra población, el 61.3% de aquellos con tumores metastásicos tuvieron  $\geq 2$  CTCs/7.5 mL. El grupo de Allard *et al.* estudiaron 196 pacientes con CCR metastático y el 30% presentó  $\geq 2$  CTCs. Este porcentaje es significativamente más bajo que el observado en nuestra población (22). En un estudio reciente de 456 pacientes de

CCR metastático, el grupo de Meropol *et al.* demostraron que el número de CTCs evaluado mediante el sistema CellSearch es un factor pronóstico independiente para la SG y la SLE (23). El nuestro es el único grupo con resultados publicados de CTCs en estadios localizados de CCR mediante el uso del sistema CellSearch. En un estudio previo, encontramos una correlación entre el número de CTCs y el estadio tumoral en este tipo de tumor (24).

## **VI. CONCLUSIONES**

En conclusión, la detección de CTCs por el sistema CellSearch es un método altamente reproducible y que merece una mayor evaluación en tumores de tipo epitelial, como el de mama y colon. Un límite de  $\geq 2$  CTCs puede ser considerado como patológico, aunque el umbral para significación pronóstica puede diferir entre los distintos tipos de tumores. El número de CTCs detectado fue significativamente más alto en el estadio de metástasis en comparación con estadios más tempranos, y no se encontraron diferencias entre tumores epiteliales con gran afinidad por la diseminación hematológica como el adenocarcinoma de mama y colon (25). Sería necesario un mayor seguimiento en nuestras series para evaluar el valor pronóstico de la presencia de CTCs y su valor predictivo de respuesta en la terapia sistémica.



## **VII. ABREVIATURAS**

CLAM, cáncer localmente avanzado de mama.

CTC, células tumorales circulantes.

AC, Adriamicina-Ciclofosfamida.

AT, Adriamicina-Docetaxel.

TA, Docetaxel-Adriamicina.

SG, supervivencia global.

SLE, supervivencia libre de enfermedad.

OR, odds ratio.

HR, hazard ratio.

IC, intervalo de confianza.

RPC, respuesta patológica completa.

RP, respuesta parcial.

EE, enfermedad estable.

EP, enfermedad progresiva.

TNM, Tumor-Node-Metastasis staging.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol*, 2002; 20: 3628-36.
2. Ueno NT, Buzdar AU, Singletary SE, et al. Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M. D. Anderson Cancer Center. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 321-329.
3. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 448-56.
4. NIH Consensus Conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264:1444-1450.
5. O'Connell MJ, Laurie JA, Kahn MJ et al. Prospectively randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy in patients with high-risk colon cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:295-300.
6. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:1196-1206.
7. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N Eng J Med* 2003; 349:247-257.
8. O'Connell MJ, Maillard JA, Kahn MJ et al. Controlled trial of lfuouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15:246-250.
9. Comparasion of fluouracil with adicional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant cheotherapy for colorectal cancer: a randomized trial. QUASAR Collaborative Group. *Lancet* 2000; 355:1588-1596.

10. Liotta LA et al. Principles of molecular cell biology of cancer: cancer metastasis  
DeVita V. T. Hellman S. Rosenberg S. A. eds. Cancer: Principles and Practice of  
Oncology, : 98-115, J. B. Lippincott Co. Philadelphia 1992.
11. Mori M et al. Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in  
lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain  
reaction in patients with gastrointestinal or breast carcinomas. J. Clin. Oncol 1998;  
16: 128-132.
12. Redding W. H et al. Detection of micrometastases in patients with primary breast  
cancer. Lancet 1983; 2: 1271-1273.
13. Stahel R.A, et al. Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by  
monoclonal antibody. J. Clin. Oncol. 1985; 3: 455-456.
14. Cristofanelli M. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in  
metastatic breast cancer. N Engl J Med 2004; 351:781-91.
15. Allard WJ. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but  
not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. Clin Cancer Res  
2004; 10:6894-904.
16. Dawood S, Broglio K, Valero V et al (2008) Circulating tumor cells in metastatic  
breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system?  
Cancer 113:2422-2430.
17. Cristofanilli M, Broglio KR, Guarneri V et al (2007) Circulating tumor cells in  
metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. Clin Breast Cancer  
7:471-479.
18. Nolé F, Munzone E, Zorzino L et al (2008) Variation of circulating tumor cell levels  
during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic  
implications. Ann Oncol 19:891-897.

19. Ghossein RA (1999) Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 5:1950-1960.
20. Iakovlev VV, Goswami RS, Vecchiarelli J et al (2008) Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Res Treat* 107:145-154.
21. Molloy TJ, Bosma AJ, Van't Veer LJ (2008) Towards an optimized platform for the detection, enrichment, and semiquantitation circulating tumors cells. *Breast Cancer Res Treat* 112:297-307.
22. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AG, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6897-904.
23. Meropol NJ, Cohen SJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, et al. Circulating tumor cells (CTC) predict progression free (PFS) and overall survival (OS) in patients with metastatic colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007; 25:166s (abstract 4110).
24. Sastre J, Maestro ML, Puente J, Veganzones S, Alfonso R, Rafael S, Garcia-Saenz JA, et al. Circulating tumor cells in colorectal cancer: correlation with clinical and pathological variables. *Ann Oncol*. 2008; 19:935-938.
25. Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, et al. Detection of disseminated colorectal cancer cells in lymph nodes, blood and bone marrow. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1830-6.
26. García-Sáenz JA, Martín M, Maestro M, Vidaurreta M, Veganzones S, Villalobos L, Rodríguez-Lajusticia L, Rafael S, Sanz-Casla MT, Casado A, Sastre J, Arroyo M, Díaz-Rubio E. Circulating tumoral cells lack circadian-rhythm in hospitalized metastatic breast cancer patients. *Clin Transl Oncol*. 2006 Nov;8(11):826-9.

## **IX. TRABAJOS PUBLICADOS POR EL EQUIPO SOBRE CTCs EN 2009.**

### **1. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages.**

Maestro LM, Sastre J, Rafael SB, Veganzones SB, Vidaurreta M, Martín M, Olivier C, DE La Orden VB, Garcia-Saenz JA, Alfonso R, Arroyo M, Diaz-Rubio E.

Anticancer Res. 2009 Nov;29(11):4839-43.

### **2. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: timing of blood extraction for analysis.**

Martín M, García-Sáenz JA, Maestro De las Casas ML, Vidaurreta M, Puente J, Veganzones S, Rodríguez-Lajusticia L, De la Orden V, Oliva B, De la Torre JC, López-Tarruella S, Casado A, Sastre J, Díaz-Rubio E.

Anticancer Res. 2009 Oct;29(10):4185-7.

### **3. Circulating tumour cells in locally advanced breast cancer.**

García-Sáenz JA, Martín M, Maestro ML, Vidaurreta M, Veganzones S, Rafael S, Casado A, Bobokova J, Sastre J, De la Orden V, Arroyo M, Díaz-Rubio E.

Clin Transl Oncol. 2009 Aug;11(8):544-7.